

10/537319

JC20 Rec'd PCT/PTO 01 JUN 2005

Docket No.: 20489/0202976-US0
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Chang S. Park et al.

Application No.: Not Yet Assigned

Confirmation No.: N/A

Filed: Concurrently Herewith

Art Unit: N/A

For: INHIBITOR OF ANGIOGENESIS AND KIT
FOR TREATING CANCER COMPRISING
THE INHIBITOR

Examiner: Not Yet Assigned

AFFIRMATION OF CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Korea, Republic of	10-2002-0076022	December 2, 2002

10/537319

Application No.: Not Yet Assigned

2

Docket No.: 20489/0202976-US0

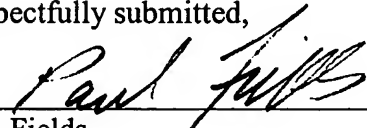
JG20 Rec'd PCT/PTO 01 JUN 2005

In support of this claim, attached is Form PCT/IB/304 evidencing receipt of the priority document on December 16, 2003 during prosecution of International Application No. PCT/KR03/02622.

Dated: June 1, 2005

Respectfully submitted,

By


Paul Fields

Registration No.: 20,298

DARBY & DARBY P.C.

P.O. Box 5257

New York, New York 10150-5257

(212) 527-7700

(212) 527-7701 (Fax)

Attorneys/Agents For Applicant

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

KIM, Sun-young
Korea Coal Center, 10th Floor, 80-6
Susong-Dong, Chongro-Ku
SEoul 110-727
Republic of Korea

Date of mailing (day/month/year) 29 December 2003 (29.12.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference OF03P230	
International application No. PCT/KR03/02622	International filing date (day/month/year) 01 December 2003 (01.12.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 02 December 2002 (02.12.02)
Applicant DOOSAN CORPORATION et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
02 Dece 2002 (02.12.02)	10-2002-0076022	KR	16 Dece 2003 (16.12.03)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338-70-90

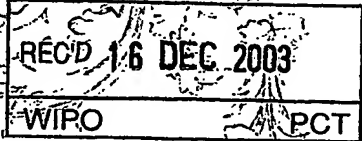
Authorized officer:

Christina PARIANOU

Telephone No. (41-22) 338 9999

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0076022
Application Number

출원년월일 : 2002년 12월 02일
Date of Application DEC 02, 2002

출원인 : 주식회사 두산
Applicant(s) DOOSAN CORPORATION

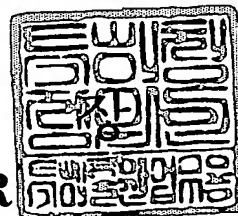
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 12 월 01 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.12.02
【발명의 명칭】	신생혈관생성 억제제 및 그를 포함한 암 치료용 키트
【발명의 영문명칭】	Inhibitor of angiogenesis and kit for treating cancer comprising the inhibitor
【출원인】	
【명칭】	주식회사 두산
【출원인코드】	1-1998-000923-6
【대리인】	
【성명】	최원현
【대리인코드】	9-1998-000569-6
【포괄위임등록번호】	2002-054700-0
【대리인】	
【성명】	김영철
【대리인코드】	9-1998-000040-3
【포괄위임등록번호】	2002-054699-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박장서
【성명의 영문표기】	PARK, Chang Seo
【주민등록번호】	540811-1066814
【우편번호】	427-040
【주소】	경기도 과천시 별양동 주공APT 710-401
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김진욱
【성명의 영문표기】	KIM, JinWook
【주민등록번호】	651120-1009923
【우편번호】	449-846
【주소】	경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 한국APT 102-306
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

서기범

【성명의 영문표기】

SUHR, Ki-Beom

【주민등록번호】

590616-1405510

【우편번호】

302-243

【주소】

대전광역시 서구 관저동 990 105-2003

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이창희

【성명의 영문표기】

LEE, Chang-Hee

【주민등록번호】

770203-1405520

【우편번호】

302-170

【주소】

대전광역시 서구 갈마동 780번지

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이중훈

【성명의 영문표기】

LEE, Jeong-Hoon

【주민등록번호】

531225-1095133

【우편번호】

302-120

【주소】

대전광역시 서구 둔산동 크로바 107-807

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

박장규

【성명의 영문표기】

PARK, Jang-Kyu

【주민등록번호】

440223-1019613

【우편번호】

302-120

【주소】

대전광역시 서구 둔산동 크로바 107-220

【국적】

KR

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 최원현 (인) 대리인
 김영철 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20 면 29,000 원

【가산출원료】

5 면 5,000 원

1020 6022

출력 일자: 2003/12/8

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

0 항 0 원

【합계】

34,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 신생혈관생성 억제제 및 그를 포함한 암 치료용 키트에 관한 것으로서, 본 발명에 의한 신생혈관생성 억제제는 테트라아세틸피토스핑고신을 함유한 것을 특징으로 하며, 본 발명에 의한 암 치료용 키트는 테트라아세틸피토스핑고신 함유 신생혈관생성 억제제를 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 의한 신생혈관생성 억제제 및 그를 포함한 암 치료용 키트를 이용하면 신생혈관생성을 효과적으로 억제함으로써 혈관중, 종양, 건선 등 신생혈관생성이 현저히 증가되는 질환을 치료 및 예방할 수 있으며, 또한 생체에 부작용을 발생시키지 않으면서도 암세포의 증식을 억제하며 암의 전이 또한 억제할 수 있다.

【대표도】

도 1.

【색인어】

테트라아세틸피토스핑고신, 신생혈관생성, 전이, 암

【명세서】

【발명의 명칭】

신생혈관생성 억제제 및 그를 포함한 암 치료용 키트{Inhibitor of angiogenesis and kit for treating cancer comprising the inhibitor}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신(TAPS) 용액을 각각 0.1 μ M, 1 μ M, 2 μ M 및 5 μ M 처리한 후 4일째 측정된 혈관의 수를 음성 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명에 의한 TAPS 용액을 각각 0.1 μ M, 1 μ M, 2 μ M 및 5 μ M 처리한 후 4일째 측정된 육아 조직 면적을 음성 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 함유 용액의 HUVEC 세포에 대한 독성 검사 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 함유 용액의 신생혈관생성 측정 시험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 함유 용액의 신생혈관생성 측정 시험 결과를 촬영한 사진이다.

도 6은 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 용액이 혈관상피세포의 이동(migration)을 억제하는 것을 나타내는 사진이다.

도 7은 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 용액이 혈관상피세포의 이동(migration)을 억제하는 것을 나타내는 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 본 발명은 신생혈관생성 억제제 및 그를 포함한 암 치료용 키트에 관한 것으로서 테트라아세틸피토스핑고신 유도체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- > 신생혈관생성(angiogenesis)이라는 과정은 1935년도 태반에서 새로운 혈관의 생성이 관찰되면서 연구되기 시작하여 수정란 착상, 태아의 성장, 상처치료, 여성의 생리, 관절염, 당뇨병성 망막 증식증 등 다양한 분야에서 관찰되었다. 암세포 주위에서 많은 혈관이 관찰되며, 출혈이 쉽게 발생하는 것은 종종 관찰되어 왔으며, 암 발생 및 암세포의 성장 및 전이에 신생혈관의 생성이 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀짐에 따라 신생혈관의 생성을 억제하는 물질에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 1960년대부터 신생혈관의 생성에 관한 연구가 본격적으로 시작되기 시작하면서 암세포의 급격한 증식이 혈관생성에 기인함이 밝혀지기 시작하였으며, 1980년대에 이르러서 처음으로 혈관생성인자가 발견되기 시작하였다. 1990년대에 신생혈관생성 억제인자 및 신생혈관억제제가 개발되기 시작하였고 암세포증식억제제로서의 가능성이 급속히 확대되어 암의 치료 가능성을 확인하기 위한 많은 임상연구가 진행되기 시작하였다.
- 10> 암세포의 발생 및 증식과정을 보면 우선 종양성장인자에 의한 증식기를 관찰 할 수 있다. 이 시기에는 여러 가지 종양 성장인자, 혈관생성인자의 발현이 왕성해지면서 암세포 및 신생혈관이 발생한다. 이러한 시기를 거치고 나면 암세포의 침윤이 시작하는 시기가 진행되는데, 이 시기에는 기저막과 세포외 기질을 용해하는 단백질 분해효소와 단백질 분해효소 억제물질 간의 불균형이 발생하여 단백질 분해효소인 MMP-2(Matrixmetalloproteinase-2),

MMP-9(Matrixmetalloproteinase-9), uPA(Urokinase type plasminogen activator)등이 증가하고 단백질 분해효소 억제에 관여하는 PAI-1(Plasminogen activator inhibitor-1), TIMP(Tissue inhibitor of metalloproteinase)등이 감소하는 현상이 발생한다. 그리고 마지막으로 암의 전이가 발생하는 시기로 이 시기에는 세포 유착 분자의 활성이 증가되어 세포의 부착능이 증가하고 암세포의 전이가 본격적으로 발생하게 된다. 이러한 암 발생 및 전이과정에서 나타나는 여러 가지 변형된 생물학적 활성은 각각의 특이적 억제제를 사용하여 조절이 가능하므로 이러한 개념에 근거한 생물학적 치료에 대한 연구는 활발히 진행되기 시작하였고, 선택적 치료를 통한 치료효과의 개선을 기대하게 되었다.

<11> 암세포의 침윤 및 혈관생성에는 우선 단백질 분해효소가 필수적이다. 암세포, 섬유세포, 내피세포는 단백질 분해효소를 생성하여 세포외 기질과 기저막을 용해시켜 암의 침윤과 혈관 생성을 유도한다. 이러한 과정에 관여하는 단백질 분해효소로는 세린프로테아제(Serine Protease)와 매트릭스메탈로프로테아제(MMPs)가 있다. 이러한 단백질 분해효소가 세포외 기질을 분해하는 과정에서 uPA(urokinase type plasminogen activator)는 플라스미노젠(plasminogen)을 플라스민(Plasmin)으로 전환시켜 암세포 주위의 피브린(fibrin), 피브로넥틴(Fibronectin), 프로테오글리칸(proteoglycan), 라미닌(Laminin)을 파괴시키고, 콜라제나제(Collagenase)를 활성화시켜 콜라젠을 분해시킨다. 그러나 uPA는 PAI-1(plasminogen activator inhibitor-1)에 의해 억제되므로 이를 이용하여 암세포의 혈관 생성능과 전이능을 조절할 수 있을 것으로 기대된다.

<12> 암세포에서는 주로 MMP-2와 MMP-9가 활성화 되어 있다. MMP-2는 암세포의 세포막에 존재하는 MMP에 의해 활성화 되며, 반대로 TIMP에 의해 활성이 억제된다. 따라서 최근에는 이러한

MMP와 TIMP의 불균형을 조절하는 것이 암세포의 혈관 형성, 전이 및 침윤 억제에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대되어 새로운 치료의 개념으로 제시되었다.

암세포는 혈관 형성에 의해 영양분을 공급하지 못하면 그 성장에 한계가 있게 된다. 또한 혈관형성은 영양분 공급이외에도 전이의 주요 통로가 된다. 종양 혈관 생성의 정도와 전이와의 상관성은 이미 잘 알려져 있으며, 원 발병 부위에서의 미세 혈관 밀도가 암의 전이 및 후 예측에 중요한 역할을 하고 있음이 여러 암세포에서 입증되었다. 최근에는 혈관생성인자에 대한 단일 클론 항체(Monoclonal antibody)가 개발되어 환자의 혈액에서 직접 혈관생성인자(bFGF, VEGF, TGF- β 등)를 측정함으로써 혈관생성의 정도를 측정할 수 있게 되었다.

12> 신생 혈관 생성 억제를 통한 암의 치료 개념은 암세포와 정상세포를 비교하여 암 발생에 의해 교란된 생물학 변화를 교정함으로써 암의 분화, 성장, 전이를 막고 암 성장을 정지시킨다는 것이다. 이러한 개념으로 MMP억제제가 1980년대부터 합성되어 암 치료에 사용되기 시작하였다. 하지만 실제 임상연구결과에서는 아직 그 효과가 기대에 미치지 못하고 있다. 이러한 원인으로서는 환자군의 선택에 있어서 이미 암의 전이가 일어난 환자를 대상으로 임상이 진행되었기 때문으로 판단되고 있다.

15> 종양세포의 증식과 전이 과정에는 신생혈관의 생성이 필수적이다. 또한 신생혈관은 암세포 전이의 주된 경로가 된다. 내피세포의 증식과 이동은 성인에서 상처치유나 여성의 경우 생리시기를 제외하고는 암세포에서만 활발히 발생하는 현상이다. 결국 정상조직과 달리 암 조직에서 주로 발생하는 혈관생성증가는 암 치료 시 매우 선택적인 치료의 목표(Target)가 되며, 이론적으로 볼 때 부작용의 위험이 적으며, 다른 항암 치료와 병행하여 치료효율을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 결국 신생혈관생성을 효과적으로 억제하는 물질은 혈관종, 종양, 건선 등 신생혈관의 생성이 현저히 증가된 질환의 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명의 목적은 신생혈관생성을 효과적으로 억제함으로써 혈관중, 종양, 건선 등 신생혈관생성이 현저히 증가되는 질환을 치료 및 예방하는 것이다. 또한 생체에 부작용을 발생시키지 않으면서도 암세포의 증식을 억제하며 암의 전이 또한 억제할 수 있는 의약 조성물을 제공하는 것을 목적으로 하고 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- 7> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 의한 신생혈관생성 억제제는 테트라아세틸피토스핑고신을 함유한 것을 특징으로 한다.
- 8> 또한, 본 발명에 의한 암 치료용 키트는 테트라아세틸피토스핑고신을 함유한 신생혈관생성 억제제를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- 19> 상기한 암 치료용 키트는 항암제 및 방사선 조사 장치를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- 20> 상기한 암 치료용 키트에 있어서, 상기 항암제는 스펜고지질 유도체인 것을 특징으로 한다.
- 21> 상기한 암 치료용 키트에 있어서, 상기 스펜고지질 유도체는 피토스핑고신, 엔아세틸피토스핑고신, C6 피토세라마이드, C8 피토스핑고신, 디메칠스핑고신, 디메칠피토스핑고신 및 스펜고신으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 스펜고지질 유도체인 것을 특징으로 한다.
- 22> 이하 본 발명에 의한 신생혈관생성 억제제 및 그를 포함한 암 치료용 키트에 대해서 더욱 상세히 설명한다.

- <23> 본 발명에 의한 조성물은 신생혈관의 생성을 억제하는 효능이 뛰어난 스핑고지질을 포함하는데, 구체적으로 본 발명자들은 피토스핑고신(Phytosphingosine)의 아세틸화된 유도체인 테트라아세틸피토스핑고신(Tetraacetylphytosphingosine)이 신생혈관의 생성을 강력히 억제하고 인체 재대 정맥 내피세포(HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell) 세포주의 이동(Migration)을 억제하여 악성 종양, 혈관종 및 건선등 신생혈관의 생성이 왕성한 질환의 치료에 효과적이라는 것을 발견하였다.
- <24> 악성종양에서의 혈관생성은 암세포에 영양분을 공급하여 암세포가 급속히 성장하도록 함과 동시에 암세포의 이동통로가 되어 다른 조직 및 기관으로 암세포를 전이시키는 역할을 한다. 한편 건선등의 피부질환에서도 피부의 과각화가 일어난 부위에서 많은 신생 혈관이 관찰되고 있다. 이러한 관점에서 신생혈관생성 억제제는 암세포의 성장을 억제하며 전이를 막아주는 역할을 하며, 부작용도 거의 없을 것으로 보여 암 치료의 효과를 획기적으로 증가시킬 것으로 기대되며, 많은 연구가 집중되고 있는 분야이다. 또한 신생혈관생성 억제제는 치료의 목표가 뚜렷하여 효과를 기대할 수 있는 환자를 잘 선별하여 여러 항암 치료와 병행할 경우 치료의 효과를 높일 것으로 기대된다.
- <25> 스핑고지질(Sphingolipid)은 세포 내 신호전달에 관여하여 세포의 성장(Proliferation)과 분화(Differentiation) 및 사멸(Apoptosis or programmed cell death)에 중요한 역할을 수행하는 물질로 잘 알려져 있다. 세라마이드(Ceramide)는 스핑고지질의 일종으로 스핑고신(Sphingosine) 기본 골격에 지방산(Fatty acid)이 N-아실(N-acylation)결합되어 있는 구조를 가지고 있으며, TNF- α , Fas등의 신호를 받아 스핑고미에린(Sphingomyelin)이 분해되면서 생성되어 신호전달의 2차 전령자(Second messenger)로서 기능하여 세포의 운명을 결정짓는다. 스핑

고미에린은 스핑고미에리나제(Sphingomyelinase)에 의해 분해되어 세라마이드로 전환되며, 이는 다시 세라미다제(Ceramidase)에 의해 지방산이 분리되어 스핑고신으로 전환된다. 스핑고신은 스핑고신키나제(Sphingosine kinase)에 의해 스핑고신-1-인산(Sphingosine-1-phosphate)으로 전환되며 이는 리아제(Lyase)에 의해 분해된다. 세라마이드 및 스핑고신 장쇄염기는 주로 세포를 죽음으로 유도하며(Apoptosis), 스핑고신에 인산기가 결합되어 있는 스핑고신-1-인산은 세포의 성장 및 분화를 촉진하는 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 세포 내에서는 스핑고신과 인산화된 스핑고신의 균형에 의해 세포의 성장, 분화 및 죽음으로 연결되므로 스핑고지질의 농도변화는 세포의 운명에 치명적인 결과를 유발하게 된다. 대부분의 항암제가 결과적으로는 세포내의 세라마이드의 양을 증가시켜 세포를 아포토시스(Apoptosis)로 유도하는 기작을 갖는다는 것은 잘 알려진 사실이다. 암세포의 경우는 세라마이드 대사가 정상세포와 달리 세라마이드의 함량이 정상세포에 비해 적어 아포토시스로 가지 않고 계속적으로 성장하는 것으로 알려졌다. 세라마이드 및 스핑고신 장쇄염기류가 암세포를 아포토시스로 유도하는 것은 여러 연구에 의해 밝혀졌는데 최근에는 효모에서 생산하는 스핑고지질인 피토스핑고신의 다양한 유도체도 암세포를 아포토시스로 유도하는 것으로 밝혀지고 있다.

- 26> 세라마이드 대사를 조절하여 암세포를 괴사(Apoptosis)시키고자 하는 시도에 많은 연구가 진행되고 있다. 우선 암세포에 여러가지 화학요법 및 방사능 조사요법은 결과적으로 암세포내의 세라마이드의 생성을 유도하고 암세포를 아포토시스로 유도한다. 또한 암세포에 세라마이드 및 스핑고지질 장쇄 염기를 직접 처리하는 방법도 암세포를 아포토시스로 유도하는 한 방법이 될 수 있다. 또 다른 접근 방법으로는 암세포의 세라마이드 함량이 낮아지는 것을 막기 위해 세라미다제 저해제(Ceramidase inhibitor)를 처리하여 세라마이드의 분해를 막거나, DMS(Dimethylsphingosine)와 같은 스핑고신키나제 저해제를 처리함으로써 스핑고신이

스핑고신-1-인산으로 전환되어 암세포를 성장으로 유도하는 것을 억제하는 방법이 효과적으로 사용될 수 있다.

> 스핑고신-1-인산은 혈액에 많이 존재하면서 여러 외부반응의 신호를 전달하는 역할을 수행한다. 상처로 인해 혈관에 손상이 발생하면 혈액내의 스핑고신-1-인산이 다량 분비되어 혈관생성을 촉진하고 상피세포의 이동을 촉진하는등 상처를 빠르게 치유하는 작용을 하는 것으로 알려졌다. 또한 스핑고신 유도체의 일종인 스핑고신포스포릴콜린 (SPC:sphingosinephosphorylcholine)이 상처 치유에 우수한 효과를 보인다는 것도 잘 알려진 사실이다.

8> 앞선 많은 연구에서 스핑고신 장쇄염기가 암세포를 죽이는 효과가 있는 것은 암치료에 스핑고지질이 효과적으로 사용될 수 있음을 보여주는 것이다. 그러나 더불어 혈관상피세포의 이동(Migration)을 억제하고 신생혈관생성을 효과적으로 억제하면서 아폽토시스를 유발시키는 물질은 암세포의 성장을 억제하고 괴사시키는 효과가 더욱 좋을 것으로 기대된다.

29> 효모에서 생산되는 피토스핑고신의 유도체가 스핑고신과 마찬가지로 다양한 암세포를 괴사(Apoptosis)시키는 것은 최근들에 많이 보고되고 있다. 피토스핑고신의 유도체(피토스핑고신, N-아세틸피토스핑고신, 테트라아세틸피토스핑고신, C6 피토세라마이드, C8 피토세라마이드 등)는 케라티노사이트(HaCat : Keratinocyte), 피브로브라스트 (Fibroblast), CHO(Chinese hamster ovarian cell), HL-60(Human leukemia), B16F10(Melanocyte cell line), U937(Monocyte)등 다양한 세포주 및 암세포주(H460, A539 : lung cancer)에서 아폽토시스를 유발하는 것으로 나타났다. 또한 피토스핑고신 유도체는 프로테인키나제 C (Protein kinase C) 및 포스포리파제 D (Phospholipase D)를 억제하는 효과가 있어 여러 염증반응에도 관여할 것으로 생각된다.

본 발명의 화합물은 경구, 비경구, 직장, 질, 국소, 경피, 정맥내, 근육내, 복강내, 피하 등으로 투여될 수 있다. 활성 화합물의 투여량은 물론 치료 받을 대상, 치료할 특정 질환 또는 병리상태, 질환 또는 병리상태의 심각도, 투여 경로, 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준내에 있다. 일반적으로, 투여량은 대략 0.01 mg/kg/일 내지 대략 2000 mg/kg/일 범위일 것이다. 바람직한 투여량은 0.5mg/kg/일 내지 2.5mg/kg/일이다.

본 발명의 화합물은 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 약학 조성물로 제형될 수 있다. 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, by E.W. Martin (Merck Publ. Co., Easton, PA)]에는 전형적인 담체와, 본 발명의 조성물을 제조하는데 이용될 수 있는 통상적인 약학 조성물 제조방법이 기재되어 있다. 본 발명의 화합물은 기타 항암제 화합물과 함께 투여될 수도 있다. 또한 조성물은 질환 치료를 위한 다른 조성물 및 과정과 함께 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 의한 조성물의 투여와 함께 수술, 방사선 또는 화학요법으로 치료될 수 있다.

32> 의도된 투여양식에 따라, 약학 조성물은 고체, 반고체, 또는 액체 투여 형태일 수 있다. 투여 형태의 예는 정제, 알약, 캡슐, 좌약, 작은 봉지, 과립, 분말, 크림, 로션, 연고, 반창고, 액체 용액, 현탁액, 및 분산액, 에멀션, 시럽 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 활성 성분은 리포솜, 미세입자, 또는 마이크로캡슐 등에 캡슐화될 수도 있다.

<33> 통상적인 무독성 담체는 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 활석, 셀룰로스, 글루코스, 수크로스, 덱스트로스, 글리세롤, 마그네슘 카보네이트, 트리글리세라이드, 오일, 용매, 멸균수, 및 등장 식염수의 약제 등급을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 정제, 알약, 과립 등과 같은 고체 조성물은 편의상 코팅될 수 있다. 전형적으로, 정맥

내 투여를 위한 조성물은 멸균 등장 수성 완충액내의 용액이고 주사 부위의 통증을 완화시키기 위해 국부 마취제를 포함한다. 원한다면, 약제는 습윤제, 유화제, pH 완충제 등과 같은 소량의 무독성 보조 물질을 함유할 수도 있다. 이러한 보조 물질의 예는 나트륨 아세테이트, 솔비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민, 및 트리에탄올아민 올리에이트를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 조성물은 안정제, 항산화제, 결합제, 착색제, 향미제, 방부제, 및 농후제와 같은 부형제를 포함할 수도 있다.

> 본 발명에 의한 신생혈관생성 억제제는 테트라아세틸피토스핑고신을 전체 조성물에 대해서 0.001중량% 내지 99중량%의 테트라아세틸피토스핑고신을 함유하는 것이 바람직하다. 0.001중량% 미만인 경우에는 신생혈관생성 효과가 미미하기 때문이며, 99중량% 이하로 정한 이유는 다른 첨가물이나 불순물의 존재 때문이다.

5> 이하, 본 발명의 바람직한 일실시예들을 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명하나, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

36> 본 발명자들은 하기와 같이 테트라아세틸피토스핑고신의 아포토시스 및 신생혈관생성 억제 효과를 측정함으로써 테트라아세틸피토스핑고신이 암세포의 아포토시스를 유발함과 동시에 신생혈관의 생성을 억제함으로써 암치료에 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 입증하였다.

37> <실시예 1: 생체내 상처치료시험(In vivo wound healing assay) 동물실험>

본 연구에 사용한 실험동물은 암컷 New Zealand White 토끼(체중 2.0 Kg)를 사용하였다. 실험물질로는 음성 대조군(비교예1)에 사용될 대조 용액으로 0.1% BSA(bovine serum albumin) 함유 PBS용액(BSA-PBS 용액)을 준비하고, 양성 대조군으로서 스펅고실포스포릴콜린(비교예2), 피토스핑고신(비교예3), N-아세틸피토스핑고신(비교예4) 및 실험군으로서 테트라아세틸피토스핑고신 (tetraacetyl phytosphingosine)(실시예1) 각각을 에탄올 혹은 메탄올에 녹여 일정량을 실리콘 유리튜브 내에서 질소가스로 충전한 다음 0.1 % BSA-PBS용액을 넣어 워터 소니케이터 (water sonicator)와 보텍스(vortex)를 사용해서 커플링(coupling)을 시킨 후 실험 동물의 창상 부위에 점적 혹은 피내 주사하였다. 동시에 테트라아세틸피토스핑고신의 농도에 따른 신생 혈관생성 효과를 알아보기 위하여 각각 0.1, 1, 2, 5 μ M의 농도로 처리한 후 그 결과를 비교하였다. 실험 동물을 실험하기에 적합하게 제작된 특수 스테인레스 케이지에 넣은 후 케타민 (ketamine : 3-4 mg/Kg) 근육 주사를 하여 마취를 시킨 후 양측 귀의 안쪽 면의 털과 각질을 면도와 세척 과정을 통해서 제거하고 나서 70 % 에탄올로 소독을 실시하였다. 가능한 한 무균 상태에서 6 mm 피부 조직검사용 펀치 (Stiefel사, 독일)를 사용하여 귀 한쪽 당 네 군데의 전층 창상을 낸 후 각각의 창상 부위에 30 - 50 μ l 정도의 상기 대조 용액 혹은 각각의 치료 물질을 점적 혹은 피내 주사한 후 Cathereep (Nichiban Co., 일본 동경)를 창상의 크기 보다 큰 크기로 잘라서 밀봉하여 창상의 오염과 딱지(crust) 형성을 막아주었다. 그런 다음 2 x 2 거즈로 창상을 보호하고, Elastopore (Nichiban Co., 일본 동경)로 귀를 감은 후 토끼 한 마리 당 한 개의 사육상자(cage)에서 사육하였다. 48시간 후에도 위와 같은 과정을 반복하고, 창상을 만든 후 4일째와 8일째에 토끼를 도살하여 조직학적 연구를 위한 조직을 처리하였다. 조직학적 연구를 위한 창상 조직을 10 % 포르말린으로 48시간 동안 고정한 후 창상의 장축 부분을 중심으로 잡아 반으로 자른 후 파라핀 블록을 만들었다. 그 후 5 μ m 정도의 절편을 만들어 슬라이

드에 부착시키고 헤마톡시린과 에오신(hematoxylin & eosin) 염색을 하여 표피와 진피의 변화를 관찰하고, Massons Trichrome 염색을 실시하여 육아 조직의 교원질 형성 정도를 비교하였다.

> 염색된 조직 표본을 광학 현미경의 접안 마이크로미터(ocular micrometer)를 이용하여 이미지 분석을 위한 보정(calibration)을 먼저 시행하였다. 그런 다음 각 조직학적 변화 양상을 40배와 100배의 대물 렌즈 하에서 디지털 카메라로 촬영한 후 Pentium III 컴퓨터 내로 저장한 후 (C) 2000 Scion corporation에서 제공하는 Scion Image for Windows 소프트웨어를 이용하여 다음과 같이 이미지 분석을 실시하였다. 즉, 표피의 이동 정도는 창상의 좌측과 우측 경계 부위까지의 길이를 측정하므로 알 수 있고, 새로 형성된 표피의 두께를 1 mm 간격으로 3 군데에서 측정하여 평균값을 구하므로 측정할 수 있었다. 진피의 육아 조직 형성 정도를 비교하기 위해서 세가지 방법을 사용하였다. 첫째로, 새로 형성된 육아 조직의 전체 넓이를 측정하여 비교하고, 둘째로는 창상의 가운데 부위에서 6군데를 정하여 고배율 (100배) 하에서 섬유모세포 등의 세포 숫자를 세어 평균을 내어서 비교하고, 마지막으로는 세포 숫자를 세는 방법과 같은 방법으로 육아 조직 내의 모세혈관의 숫자를 세어 신생 혈관 형성 정도를 측정하였다. 가피(두꺼운 딱지, eschar)가 있을 경우에는 본 연구의 측정에 포함시키지 않았다. 상기 음성 대조군, 양성 대조군 및 실험군에서 얻어진 자료들은 짝의 스튜던트 T 검정(paired student's t test)을 시행하여 통계학적으로 분석하였다. 그 결과는 도 1, 도 2 및 표 1에 나타내었다.

<40> 도 1은 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 용액을 각각 0.1 μ M, 1 μ M, 2 μ M 및 5 μ M 처리한 후 4일째 측정된 혈관의 수를 음성 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이다. C-4는 상기 음성 대조군을 처리하고 4일 후를 의미하며, T-0.1-4는 테트라아세틸피토스핑고신(TAPS)을 0.1 μ M 처리하고 4일 후를 의미하며, T-1-4, T-2-4 및 T-5-4는 TAPS를 각각 1 μ M, 2 μ M 및 5 μ M

처리하고 4일째의 결과를 의미한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 테트라아세틸피토스핑고신을 투여한 결과 신생혈관생성이 크게 억제됨을 알 수 있다.

도 2는 본 발명에 의한 TAPS 용액을 각각 0.1 μ M, 1 μ M, 2 μ M 및 5 μ M 처리한 후 4일째 측정된 육아 조직 면적을 음성 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이다. 도 2에서 C-4는 상기 음성 대조군 처리로부터 4일 후, T-0.1-4, T-1-4, T-2-4, T-5-4는 각각 0.1 μ M, 1 μ M, 2 μ M 및 5 μ M의 TAPS를 처리하고 4일째의 결과를 의미하는 것이다. 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명에 의한 TAPS 용액이 육아 조직의 면적을 감소시키는 것을 알 수 있다.

> 한편, 상기 음성 대조군(비교예1), 스펅고실포스포릴콜린(SPC)(비교예2), 피토스핑고신(PS)(비교예3), N-아세틸피토스핑고신(NAPS)(비교예4) 및 실시예로서 테트라아세틸피토스핑고신(tetraacetyl phytosphingosine, TAPS)(실시예1) 각각에 대하여 5 μ M의 농도로 상기와 같이 실험한 후 혈관의 수와 육아 조직 면적을 측정한 결과는 다음과 같다.

3> 【표 1】

	비교예1 (음성 대조군)	비교예2:SPC (5 μ M)	비교예3:PS (5 μ M)	비교예4:NAPS (5 μ M)	실시예1:TAPS (5 μ M)
육아 조직 면적	100%	151%	112%	212%	76%
혈관의 수	100%	148%	106%	96%	31%

44> 상기 표에 나타난 바와 같이, 육아 조직 면적 증가와 혈관의 수 증가를 가장 촉진한 것은 스펅고실포스포릴콜린(sphingosinephosphorylcholine, SPC)이었으며 가장 저해한 것은 본 발명에 의한 TAPS임을 알 수 있다. 이를 통해 스펅고실포스포릴콜린의 경우 신생혈관의 생성을 촉진하며 TAPS는 억제함을 알 수 있다.

<실시에 2: HUVEC세포에 대한 독성검사 및 혈관생성 측정실험>

본 연구에 사용한 인체 태줄 혈관상피세포의 배양은 다음과 같이 시행하였다. 차가운 PBS에 담긴 태줄을 15-20cm 되게 자른 후 충분히 세척하고 나서 태줄의 양 끝 정맥에 배관(cannular)을 각각 넣은 후 봉합사로 태줄과 배관(cannular)를 잘 묶어 두었다. 태줄에 잘 연결된 각각의 배관(cannular)에 투웨이 잠금꼭지(2-way stopcock)를 연결하고, 0.45 마이크로미터 밀리포어 필터(micrometer milipore filter)를 한쪽의 잠금꼭지(stopcock)에 연결하였다. PBS로 정맥을 세척한 후 콜라게네이즈(collagenase) 용액을 넣어 37도에서 6분간 배양한다. 6분이 지난 후 헤파린(heparin) 용액 (10ml)으로 혈관 안의 콜라게네이즈(collagenase) 용액을 밀어내어 모아진 세포를 1500 rpm으로 5분 동안 원심 분리한 후 침전된 내피 세포를 FBS가 없는 M199 배지 5 ml에 현탁시키는 과정을 2회 반복하였다. 이때 얻어진 내피 세포는 5 ml의 내피세포성장배지로 현탁하여 젤라틴으로 코팅된 T25 플라스크에 옮겨서 37도, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다.

47> 한편 본 연구에 사용한 인체 섬유모세포의 배양은 다음과 같이 수행하였다. 포경수술에서 무균적으로 채취된 피부조직을 항크스 밸런스트(Hanks balanced) 용액으로 3회 세척한 후 표피와 피하지방층을 제거하고 진피조직을 적당한 크기로 잘라 35-mm 배양 접시 바닥에 침두대의 크기로 놓은 다음 충분히 점착시키기 위해 약 5분간 부리기 (5% CO₂, 37℃, Forma Scientific, Inc., Ohio, U.S.A.)내에 둔 후 배양액을 추가하였다. 약 1-2주일 후 자라 나온

섬유모세포를 0.25 % 트립신 용액과 0.02 % EDTA 용액으로 3-5분간 처리하여 분리한 후 계대 배양하였다.

<48> 세포에 대한 독성 및 성장능력 측정은 다음의 방법에 준하였다.

<49> 각종 세포 현탁액을 0.5 % 트립판 블루 용액으로 염색하여 세포수를 측정한 후 96 멀티 웰 플레이트의 컬럼 1에 해당 배지를 넣어 블랭크로 하였다. 컬럼 2부터 해당 배지에 조정된 세포들을 180 μ l씩 분주한 후 37도 배양기 안에서 12-24시간동안 배양한 다음 실험군에는 약제를 배양액의 10%인 20 μ l씩을 첨가하고 대조군에는 동량의 PBS를 첨가하였다. 2일간 추가로 배양한 후 PBS (pH 7.4)로 5 mg/ml가 되도록 조정한 MTT 용액 40 μ l를 첨가하고 다시 4시간동안 37도 배양기 내에서 배양하였다. 그 후 플레이트를 1500 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하고 멀티-채널 피펫(multi-channel pipette)으로 100% DMSO를 150 μ l를 가하여 플레이트 교반기(plate shaker)에서 흔들어 주었다. 마지막으로 ELISA 판독기(reader)로 540nm에서 흡광도를 측정한다.

<50> 혈관내피세포의 혈관생성시험은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

<51> 다음과 같은 방법을 이용해서 매트리지젤(matrigel)을 제작한다. 우선 교원질 용액은 상품화된 산-용해성(acid-soluble) Porcine type I 교원질 (3.0 mg/ml), 5x DMEM, 완충액(0.05 N NaOH, 2.2% NaHCO₃, 200 mM HEPES)을 7:2:1의 비율로 혼합해서 만든 후 24 웰 혹은 96 웰 (100-300 μ l)씩 분주한 후 37도 부란기내에 10분 정도 두어 교원질이 중합화(polymerization)되면서 젤 상태로 만들었다. 일차 배양(primary culture)하여 키운 HUVEC (계대(passage) 5 이내의 것을 사용함)을 37도에서 꺼내어 PBS로 세척한 후 트립신/EDTA로 세포를 떼어낸 후, 한 웰 당 $4-6 \times 10^4$ 세포수가 되도록 넣고, 12 - 18 시간동안 추가로 배양하였다. 그 결과는 도 3 및 도 4에 나타나 있다.

도 3은 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 함유 용액의 HUVEC 세포에 대한 독성 검사 결과를 나타낸 그래프이다. 도 3에 도시된 바와 같이, 5 μ M 이상의 TAPS 농도에서 세포의 괴사가 급격히 발생하는 것을 알 수 있다.

도 4는 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 함유 용액의 신생혈관생성 측정 시험 결과를 나타낸 그래프이다. 또한 도 5의 (a), (b) 및 (c)는 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 함유 용액의 신생혈관생성 측정 시험 결과를 촬영한 사진이다. 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 튜브 형성 테스트(Tube formation test)에서는 TAPS의 경우 0.1 μ M의 농도에서도 혈관의 생성을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있으며 1 μ M의 농도에서는 거의 완벽하게 혈관 생성을 억제함을 알 수 있었다.

4> <실시예 3 : 혈관내피세포의 이동측정시험 (migration assay)>

5> 트랜스웰 멤브레인(Transwell membrane)에 0.2% 젤라틴을 코팅한 후 4℃에서 12시간 방치하였다. 대조군으로서 상기 실시예들에서와 같이 BSA-PBS를 처리하고 실험군으로서 상기 실시예들에서와 같이 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 용액을 각각 0.1 μ M, 1 μ M 및 5 μ M 처리한 후 2시간 동안 배양한 다음, Diff Quik 용액으로 염색한 후 슬라이드 글라스에 트랜스웰 멤브레인을 올려 놓은 후 관찰하였다. 그 결과는 도 6 및 도 7에 나타나 있다.

56> 도 6은 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 용액이 혈관상피세포의 이동 (migration)을 억제하는 것을 나타내는 사진이다. 도 7은 본 발명에 의한 테트라아세틸피토스핑고신 용액이 혈관상피세포의 이동(migration)을 억제하는 것을 나타내는 그래프이다. 도 6 및 도 7에서 보는 바와 같이 TAPS의 처리농도가 높아질수록 멤브레인의 반대쪽으로 이동하는

혈관내피세포의 수가 줄어드는 것으로 보아 TAPS에 의해 혈관상피세포의 이동이 억제됨을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

- > 본 발명에 의한 신생혈관생성 억제제 및 그를 포함한 암 치료용 키트를 이용하면 신생혈관생성을 효과적으로 억제함으로써 혈관중, 종양, 건선 등 신생혈관생성이 현저히 증가되는 질환을 치료 및 예방할 수 있으며, 또한 생체에 부작용을 발생시키지 않으면서도 암세포의 증식을 억제하며 암의 전이 또한 억제할 수 있다.

【청구항 1】

테트라아세틸피토스핑고신을 함유한 신생혈관생성 억제제.

테트라아세틸피토스핑고신을 함유한 신생혈관생성 억제제를 포함하는 암 치료용 키트.

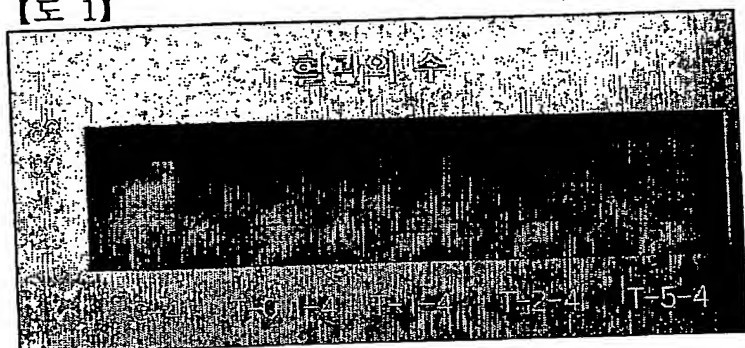
제2항에 있어서, 상기 키트는 항암제 및 방사선 조사 장치를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 키트.

제3항에 있어서, 상기 항암제는 스펙고지질 유도체인 것을 특징으로 하는 암 치료용 키

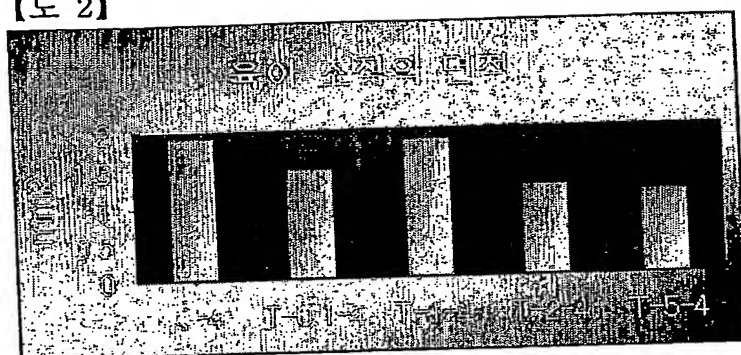
제4항에 있어서, 상기 스펅고지질 유도체는 피토스펜고신, 엔아세틸피토스펜고신, C6 피토세라마이드, C8 피토스펜고신, 디메칠스펜고신, 디메칠피토스펜고신 및 스펅고신으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 스펅고지질 유도체인 것을 특징으로 하는 암 치료용 키트.

【도면】

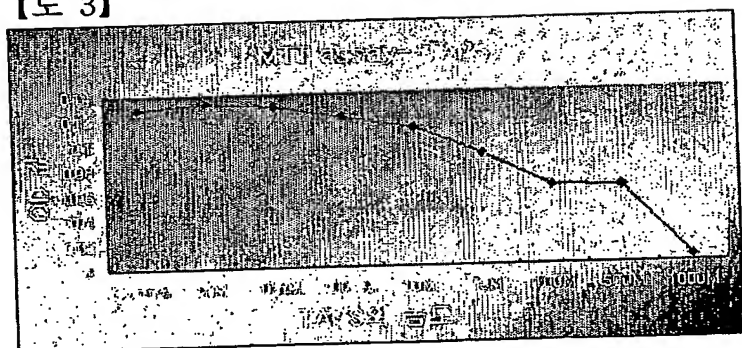
【도 1】



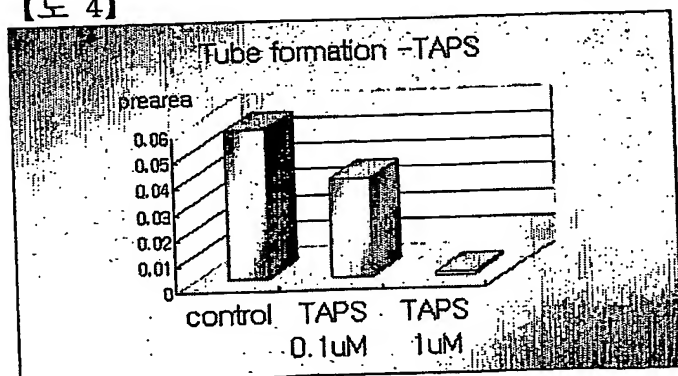
【도 2】



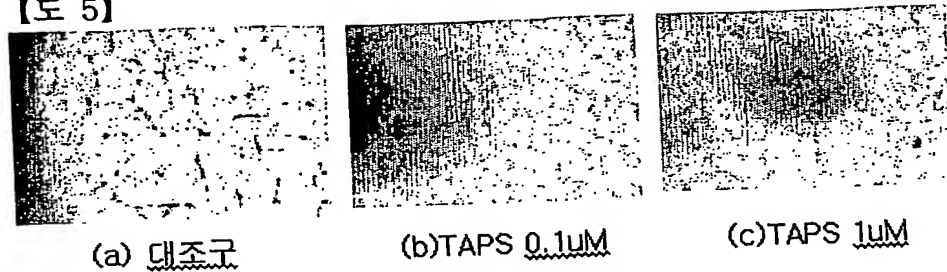
【도 3】



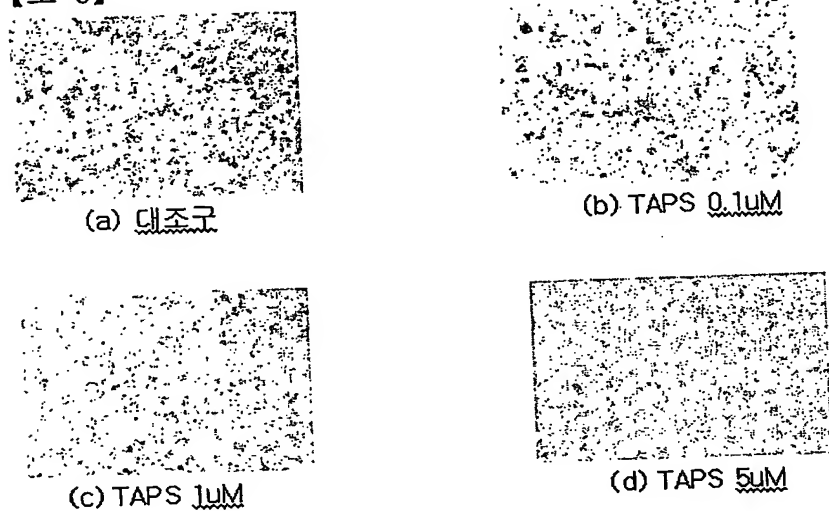
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【도 7】

